

## Kinetikai mérések $\beta$ -glükozidáz enzimmal

### 1. PNP kalibrációs görbe felvétele.

Állítsuk össze a táblázatban feltüntetett oldatsorozatot. Az összemérés után az oldatok 400 nm hullámhosszon fotometrálnak. Az abszorbancia értékeket a PNP nmólok függvényében ábrázoljuk.

Kémcső száma	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PNP ( $10^{-4}$ M)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
A puffer	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
B puffer	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
A										
PNP (nmól)										

### 2. Reakciósebesség-szubsztrát koncentráció függésének vizsgálata

Mérjük össze a táblázatban feltüntetett Szubsztrát és A puffer térfogatokat. 2-3 perc 37 oC-on történő előinkubáció után indítsuk el az enzimreakciót az enzim oldatok hozzáadásával 30 mp időeltolódással. 5 perc inkubáció után állítsuk le az enzimreakciót 2 ml B puffer hozzáadásával minden kémcsőben 30 mp időeltolódással. A sárga színű PNP terméket tartalmazó oldatok abszorbanciáját mérjük 400 nm hullámhosszon.

Szubsztrát (ml)	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15	0,2
5 mM						
A puffer	0,75	0,725	0,7	0,675	0,65	0,6
Enzim	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
A						
PNP (nmól)						
v (nmól/perc)						
1/v						
[S] (mM)						
1/[S] (1/mM)						

### 3. $K_m$ és $v_{max}$ meghatározása Lineweaver-Burk féle linearizációval

A 2. feladatban elvégzett mérések/számítások alapján  $1/[S]$  függvényében ábrázoljuk az  $1/v$  értékeket. A pontokra egyenest illesztünk. Az egyenes y tengellyel való metszéspontja adja  $1/v_{max}$  értékét, az x tengellyel való metszéspont  $-1/K_m$  értékét. Kiszámítjuk az enzimre jellemző  $K_m$  és  $v_{max}$  értékeket.